

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев, В.Н. Столярова, М.Н. Макаренко

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОФЕЙНОЙ КИСЛОТЫ

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

*Кофейная кислота оказывает иммуномодулирующее, антимикробное и антиоксидантное действие. Процент лимфоцитов, пролиферирующих под действием кофейной кислоты, увеличивался в 1,3 – 1,6 раза по сравнению с контролем. Под влиянием кофейной кислоты происходило подавление роста *Candida albicans*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Показана способность кофейной кислоты к поглощению супероксидного радикала, образующегося путем аутоокисления адреналина в щелочной среде.*

Ключевые слова: кофейная кислота, иммуномодулятор, антиоксидант, микроорганизм.

ВВЕДЕНИЕ

Кофейная кислота – 3,4-дигидроксипропановая кислота – структурно является производным фенолкарбоновой кислоты. Кофейная кислота встречается практически в каждом растении как неотъемлемый продукт вторичного метаболизма. Широкое распространение кофейной кислоты в растительном мире, в том числе в лекарственных растениях, привлекает внимание к ее фармакологическим свойствам.

Фенольные соединения, к которым относится кофейная кислота, могут обладать широким спектром фармакологической активности, малой токсичностью и высокой эффективностью при лечении многих сочетанных патологий. В частности, данные соединения проявляют антиоксидантную, иммуномодулирующую, спазмолитическую, противовоспалительную, противоаллергическую, капилляропротекторную, антитоксическую, диуретическую, антиатерогенную, противоопухолевую и радиозащитную активность. Кроме перечисленных выше эффектов, фенолы действуют как ингибиторы ряда ферментов (например, ингибируют альдозозамедлитель, ксантиноксидазу, тирозинкиназу и некоторые другие ферментные системы организма) [1-4].

В то же время гидроксибензойные кислоты, к группе которых относится кофейная кислота, оказывают антиоксидантное, противоопухолевое, антимикробное, анти-

вирусное, противогрибковое, противовоспалительное, анальгетическое, жаропонижающее, антиревматическое, гипогликемическое, желчегонное, гепатопротекторное, гиполипидемическое и кератолитическое действие [2-5].

В последние годы клинические исследования сфокусированы на потенциальных иммуностимулирующих свойствах гидроксибензойных кислот. Галловая и салициловая кислоты подавляют накопление лейкоцитов в экстравазальных участках ткани и угнетают хроническое воспаление. Хлорогеновая, галловая, эллаговая, кофейная, протокатехиновая и салициловая кислоты стимулируют образование иммуноглобулинов класса G [6,7].

Для кофейной кислоты, как отмечено выше, характерно влияние на гуморальное звено иммунной системы и отсутствие сведений о воздействии на клеточный компонент иммунитета. Для оценки влияния на пролиферативную активность клеток иммунной системы методическое руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ [8] рекомендует использовать реакцию бластотрансформации лимфоцитов (РБТЛ). РБТЛ позволяет при помощи индексов стимуляции учесть влияние испытуемого вещества на клетки при их различных исходных уровнях стимулирования.

Одними из важнейших фармакологических свойств, дополняющих иммуномодулирующую активность, являются анти-

микробный и антиоксидантный эффекты. Сочетание прямого влияния на микроорганизм с опосредованным воздействием через иммунную систему позволяет повысить эффективность использования лекарственного средства при лечении инфекционных заболеваний. Различные инфекционные процессы сопровождаются изменением оксиданто-антиоксидантного статуса организма в сторону усиления образования свободных радикалов, что можно устранить при использовании антиоксидантных средств.

Цель работы – установить иммуномодулирующую, антибактериальную, антимикотическую и антиоксидантную активность кофейной кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Раствор стандартного образца кофейной кислоты (производитель «Sigma-Aldrich», CAS [29536-44-5]) готовили следующим образом: навеску кофейной кислоты массой 50 мг растворяли в 150 мл воды очищенной при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждали и доводили до объема 200,0 мл водой очищенной.

Иммуномодулирующую активность определяли в РБТЛ *in vitro*. Культивирование лимфоидных клеток осуществляли в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640, содержащей бикарбонат натрия, глютамин и телячью сыворотку. Среда RPMI 1640 используется для выращивания лимфоидных клеток крови человека. Содержит в своем составе значительное количество фосфат-ионов. В качестве источника лимфоцитов использовали периферическую кровь здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет. Постановку реакции бластотрансформации лимфоцитов выполняли по следующей схеме. В стерильные стеклянные флаконы вносили жидкую питательную среду RPMI 1640, добавляли антибиотик канамицин для подавления развития сопутствующей микрофлоры, затем вносили культуры мононуклеарных клеток крови человека, полученные путем градиентного центрифугирования и отстаивания предварительно гепаринизированной крови. После чего в опытные флаконы добавляли исследуемые средства. В контрольные флаконы вносили растворитель (воду для инъекций). Инкубировали в течение пяти дней в атмосфере

углекислого газа при температуре 37°C. На пятые сутки культуры клеток центрифугировали и отмывали в гипотоническом растворе калия хлорида, после чего проводили отмывку уксуснокислым фиксатором. Из осадка готовили мазки и окрашивали ядерным красителем орсеином. Бластотрансформацию оценивали морфологическим методом.

Расчет индексов стимуляции (IS) проводили по формуле (1):

$$IS = a / b \quad (1)$$

где *a* – процентное содержание бластных форм среди общего количества лимфоцитов в исследуемых пробах;

b – процентное содержание бластных форм среди общего количества лимфоцитов в контрольном опыте.

Антимикробную активность исследовали на четырех видах бактерий: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), а также на одном виде грибов *Candida albicans*.

Антибактериальную активность определяли с использованием метода диффузии в агар. Для исследования использовали чистые культуры микроорганизмов, которые предварительно выращивали при температуре 37°C в течение 24 часов на скошенном мясопептонном агаре. Стандартную бактериальную суспензию готовили на стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Для этого бактериологической петлей вносили исследуемую культуру в стерильный флакон с 2 мл стерильного физиологического раствора и спектрофотометрически доводили концентрацию микроорганизмов до оптической плотности 0,125 (при длине волны 550 нм). Расплавленный и остуженный до температуры 56°C мясопептонный агар (МПА) разливали в чашки Петри, установленные на столики со строго горизонтальной поверхностью. На застывший агар с помощью автоматической пипетки в стерильных условиях в чашки Петри вносили по 1 мл соответствующей взвеси микроорганизмов. После распределения микроорганизмов стерильным шпателем по всей поверхности агара инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Избыток культуры сливали в дезинфицирующий раствор. Затем на чашке

с микроорганизмами делали пять лунок диаметром 6 мм с помощью стерильного сверла. Далее с помощью автоматической микропипетки в четыре лунки вносили по 20 мкл раствора кофейной кислоты, в пятую лунку в качестве контроля вносили растворитель, на котором готовили раствор (вода очищенная). После внесения проб чашки с культурами оставляли при комнатной температуре на 2 часа. Пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов и оценивали рост микроорганизмов.

Антиоксидантную активность изучали на модели аутоокисления адреналина по методике [9].

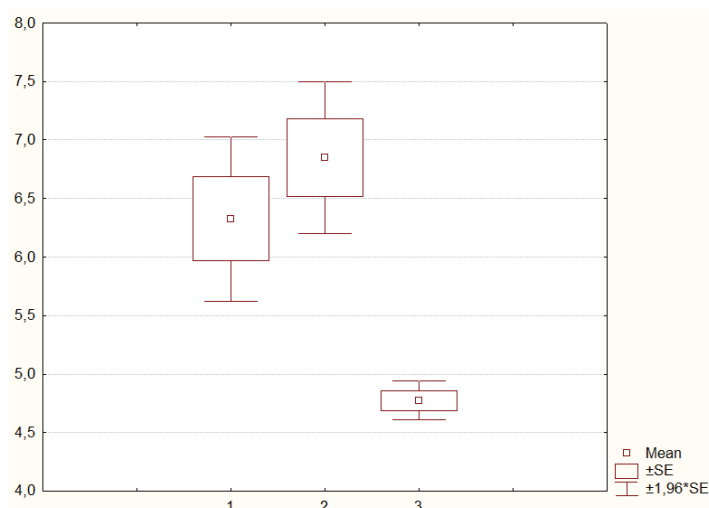
Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы «Statis-

tica 6.0». Количественные результаты исследования представляли в виде $\bar{x}_{\text{ср.}} \pm \Delta x_{\text{ср.}}$, где $\bar{x}_{\text{ср.}}$ – среднее значение выборки, $\Delta x_{\text{ср.}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины. Для сравнения двух групп использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены результаты определения иммуномодулирующей активности кофейной кислоты и наиболее распространенного представителя флавоноидов – рутина. По оси абсцисс: исследуемые (1,2) и контрольная (3) группы; по оси ординат: процент бластов среди общего количества лимфоцитов.

Из рисунка видно, что процент лимфо-



1 – рутин; 2 – кофейная кислота; 3 – контрольный опыт

Рисунок – Иммуномодулирующая активность рутина и кофейной кислоты в РБТЛ

цитов, пролиферирующих под воздействием рутина, увеличился в 1,2 – 1,5 раза, а под действием кофейной кислоты – в 1,3 – 1,6 раза по сравнению с контролем. При этом процент стимуляции для исследуемых проб статистически значимо ($p < 0,05$) отличался от аналогичного показателя для контрольных проб, то есть рутин и кофейная кислота оказывали достоверный иммуномодулирующий эффект. При этом кофейная кислота на 9% ($p < 0,05$) эффективнее стимулировала пролиферацию мононуклеаров по сравнению с рутином.

Индексы стимуляции для кофейной кислоты составили $1,44 \pm 0,14$, а для рутина – $1,33 \pm 0,16$. В процесс пролиферации под

действием рутина и кофейной кислоты вовлекалось 20 – 60% мононуклеаров, что свидетельствует о стимулирующем влиянии данных веществ на Т- и В-лимфоциты.

В таблице представлены результаты определения антибактериальной и антимикотической активности кофейной кислоты методом диффузии в агар.

Из таблицы видно, что наиболее выраженный антимикробный эффект у кофейной кислоты наблюдался по отношению к дрожжеподобному грибку *Candida albicans* и грамотрицательной бактерии *E. coli*, что может быть в дальнейшем использовано для лечения инфекций, вызванных данной группой возбудителей. Несколько

Таблица – Результаты определения антибактериальной и антимикотической активности кофейной кислоты (n=4)

Исследуемый объект	Вид микроорганизма/диаметр задержки роста, мм				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Кофейная кислота	7,8±0,9	Сплошной рост	Сплошной рост	7,3±1,5	7,8±0,8
Контроль	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост	Сплошной рост

меньше выражен эффект по отношению к грамположительному микроорганизму *S. aureus*. Исследуемые извлечения практически не влияли на подавление роста *B. subtilis* (микроорганизм с толстой клеточной стенкой) и *P. aeruginosa* (микроорганизм с плотно прилегающей слизистой капсулой). В контроле наблюдался сплошной рост тест-культур микроорганизмов.

Для определения антиоксидантной активности использовали реакцию аутоокисления адреналина. Адреналин в щелочной среде окислялся и образовывал супероксидный радикал, который поглощал электромагнитное излучение при длине волны 347 нм. Некоторые вещества (например, аскорбиновая кислота, кверцетин, токоферол, тролокс) способны поглощать данный радикал, что сопровождается уменьшением значения оптической плотности раствора.

Раствор кофейной кислоты в трех независимых сериях эксперимента поглощал супероксидный радикал адреналина на 23,54±3,74%. Для кверцетина данный показатель составил 50,63±0,93%, т.е. способность кофейной кислоты поглощать супероксидный радикал практически в два раза меньше, чем у кверцетина. Данный факт можно объяснить рядом причин: количество гидроксильных групп в молекуле кверцетина пять, а у кофейной кислоты – две; 7 звеньев сопряжения в молекуле кверцетина способствовали усилению антиоксидантных свойств по сравнению с кофейной кислотой, у которой цепь сопряжения ограничивалась пятью звеньями.

ВЫВОДЫ

Установлено, что кофейная кислота обладает иммуномодулирующей, антибактериальной, антимикотической и антиоксидантной активностью. Процент лимфоцитов, пролиферирующих под действием

кофейной кислоты в РБТЛ, увеличивался в 1,3 – 1,6 раза по сравнению с контрольными пробами. Кофейная кислота в большей степени подавляла рост *Candida albicans* и *E. coli*, несколько меньше влияла на *S. aureus* и не воздействовала на подавление роста *B. subtilis* и *P. aeruginosa*. Показана способность кофейной кислоты к поглощению супероксидного радикала, образующегося в ходе аутоокисления адреналина в щелочной среде. Изучаемое соединение поглощало супероксидный радикал на 23,54±3,74%.

SUMMARY

R.I. Lukashov, D.V. Moiseev,
V.N. Stolyarova, M.N. Makarenko
THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY
OF CAFFEIC ACID

Caffeic acid has immunomodulatory, antimicrobial and antioxidant effects. The percentage of lymphocytes proliferating under the action of caffeic acid increased by 1,3 – 1,6 times as compared with the control. The growth of *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are suppressed under the influence of caffeic acid. It was demonstrated, that caffeic acid absorbed the superoxide radical formed by autoxidation of adrenaline in an alkaline environment.

Keywords: caffeic acid, immunomodulator, antioxidant, microorganism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hansel, R. Pharmakognosie – Phytopharmazie / R. Hansel, O. Sticher. – Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2010. – 1453 p.
2. Pengelly, An. The constituents of medical plants / An. Pengelly. - Sunflower Herbals, 1990. – 109 p.
3. The Flavonoids / W. Barz [et al.]; eds. J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry. – New York: Acad. Press, 1975. – 1204 p.

4. Барабой, В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. - М.: «Наука», 1984. - 160 с.

5. Weiss, R.F. Lehrbuch der Phytotherapie / von R.F. Weiss. - 6. Aufl. - Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1985. - 442 S.

6. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties / J. Alanko [et al.] // Free Rad. Biology & Medicine. - 1999. - V. 26, № 1/2. - P. 193-201.

7. Immunotropic activity of plant extracts. IV. The effects of phenolic compounds of poplar leaves / E. Barcz [et al.] // Herba Pol. - 1998. - Vol. 44. - P. 45-51.

8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. член-корр. РАМН, профессора Р.У. Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. -

832 с.

9. Роль NO-синтазы в стимуляции опиатных рецепторов и устойчивости почек к оксидативному стрессу / Е.А. Орлова, И.А. Комаревцева // Укр. биохим журн. - 2004. - Т.76, № 1.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный ордена Дружбы
народов медицинский университет,
кафедра стандартизации
лекарственных средств
с курсом ФПК и ПК,
тел. раб. 8(0212) 370006,
тел. моб. +375297102438,
e-mail: ussr80@yandex.ru.
Мусеев Д.В.

Поступила 17.09.2012 г.